



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
TRABAJO DE FIN DE GRADO
Curso 2021-2022

Estudio del proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir residuos de mazorca maíz

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Ingeniería Química

Tutoras: María Olga Ruiz Pérez y Beatriz Blanco Alcalde

David Pacio Teso
Julio 2022



UNIVERSIDAD
DE BURGOS

Facultad de Ciencias

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO (1)**

**GRADO EN: CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
CURSO: 2021-2022**

D/Dña. María Olga Ruiz Pérez y Beatriz Blanco Alcalde, Tutoras Académicas, informan de que el alumno D/Dña. David Pacio Teso ha realizado el Trabajo Fin de Grado que lleva por título "Estudio del proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos de mazorca de maíz"

bajo su tutela y considera que la memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(* En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 4 de Julio De 2022

Firmado digitalmente
por RUIZ PEREZ MARIA
OLGA - 13130364D
Fecha: 2022.07.04
19:47:18 +02'00'

Firmado por BLANCO ALCALDE
BEATRIZ - ***1438** el día
05/07/2022 con un certificado
emitido por AC FNMT Usuarios

Fdo.: María Olga Ruiz Pérez y Beatriz Blanco Alcalde

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el visto bueno de los tutores. A tal efecto, **se incluirá en la contraportada este documento con la firma de los mismos.** (Regulación del reglamento interno de la facultad de ciencias para la gestión de la asignatura "Trabajo Fin de Grado" de la Facultad de Ciencias, aprobada en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022)

AGRADECIMIENTOS:

El trabajo presentado ha sido desarrollado en el seno del Grupo de Investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128, en el marco de los siguientes proyectos de investigación:

- VALORIZACIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA DE CASTILLA Y LEÓN MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FLUIDOS PRESURIZADOS (PROVALOR), financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU050P20).
- VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS MARINOS MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FLUIDOS SUB- Y SUPERCRÍTICOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCMPUESTOS VALIOSOS, financiado por la Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033).

ÍNDICE:

ABSTRACT	1
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- OBJECTIVES	2
3.- PARTE EXPERIMENTAL	3
3.1.- PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES	3
3.2.- RESIDUO DE MAZORCA MAÍZ	3
3.3.- PROCESO DE EXTRACCIÓN	4
3.3.1. Extracción convencional en baños agitados con agitación rotatoria (AR)	4
3.3.2. Extracción asistida con ultrasonidos (EUS)	4
3.3.3. Extracción asistida por microondas (EMW)	4
3.4.- MÉTODOS ANALÍTICOS	4
3.4.1. Determinación de la fracción de compuestos fenólicos totales (CPT)	4
3.4.2. Determinación de la fracción de compuestos flavonoides totales (CFT)	5
3.4.3. Cuantificación de compuestos fenólicos	5
3.4.4. Determinación de la capacidad reductora (CR)	5
3.4.5. Determinación de los sólidos totales en el extracto	6
3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	6
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
4.1.- RESULTADOS DE EXTRACCIÓN PARA LOS DOS RESIDUOS DE MAZORCA	6
4.1.1. Identificación de polifenoles y flavonoides en los residuos de mazorca de maíz ...	7
4.2.- COMPARACIÓN DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDO CON ULTRASONIDOS Y EN TANQUES AGITADOS	9
4.3.- RESULTADOS EN LA EXTRACCIÓN EN TANQUES AGITADOS	10
4.3.1. Estudio del efecto de la temperatura	10
4.3.2. Estudio del efecto del disolvente	12
4.3.3. Caracterización del extracto final	14
4.2.4. Correlación con capacidad reductora	17
4.4.- EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS	18
4.4.1. Tiempos de operación del EMW	18
4.4.2. Estudio del disolvente	20
4.4.3. Comparación con convencional con agitación rotatoria	20
5.- CONCLUSIONS	21
6.- BIBLIOGRAFÍA	22

ABSTRACT

Corn is currently one of the most cultivated cereals in the world, obtaining many agricultural solid residues. Corncob residue can be considered as a subproduct due to the presence of a phenolic fraction rich in flavonoids, which could be used as a substitute of synthetic antioxidant additives for different food and pharmaceutical applications. This work was focused on studying different extraction processes and operating conditions aimed at the recovery of the phenolic fraction from corncob, as well as an identification study in order to valorise the final extracts. Experiments were performed by using bath extraction with rotary agitation, ultrasound-assisted extraction, and microwave-assisted extraction. The effects of contact time, temperature (40 and 70°C) and solvent (ethanol, water, and different ethanol-water mixtures) were also examined.

Throughout the work it was possible to verify that with the use of the temperature of 70 °C better results of extraction of polyphenolic compounds and flavonoids were achieved; Like the ethanol:water mixtures, they are more effective than the use of pure solvents, the 70% mixture being the most effective. Thanks to the extractions in which mixtures are used as solvents, better results were achieved for the percentage of total polyphenolic compounds with respect to the total dry solids. It was verified that by means of the 70% ethanol-water mixture, the reducing capacity of the extract was correlated with the flavonoid fraction, in extraction with ethanol with the polyphenols and if water was used, a very poor correlation was obtained. Regarding the identified compounds, both in the ethanol:water mixtures and in the ethanol the same compounds were identified, although all of them in greater quantity in the mixtures, being the 70% where the most was obtained. In the extraction with water it was also possible to identify gallic acid, p-hydroxybenzoic acid and vanillic acid. The compound that was identified in the greatest amount was ethyl ferulate, followed by p-coumaric acid, syringic acid and kaempferol. Regarding the extraction techniques, the ultrasound-assisted one turned out to be the most effective, since compared to the agitated bath, it was possible to extract more polyphenolic compounds and flavonoids in less time. With the use of microwaves, extraction results were obtained that were very similar to those obtained by means of a bath, but using only a few minutes of extraction compared to hours in the bath, thus resulting in being more efficient.

Keywords: phenolic compounds, extraction, antioxidant capacity, solid by product valorisation; biorefinery

1.- INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz está extendido por diferentes regiones del mundo debido a su fácil adaptación a los diversos agrosistemas ocupando el segundo lugar de los cereales más cultivados en términos de superficie, alcanzando los 1144,63 millones de toneladas métricas [1,2]. En el año 2020 la superficie sembrada de maíz en Castilla y León fue de 115561 hectáreas con un rendimiento de 12734 kg/ha [3]. Las estadísticas dicen que este cultivo aumentará en los próximos años, por lo que también lo harán sus residuos, como tallos, hojas, cáscaras y mazorcas, representado este último del 47 al 50% de los residuos [1,4]. Debido al sistema económico lineal, la mayoría de estos residuos o subproductos suelen desecharse, lo que supone un problema para la sostenibilidad ecológica del planeta. La integración de estos flujos de residuos como materia prima en otro proceso industrial constituye el principio fundamental del concepto de economía circular para alcanzar el objetivo de residuo cero. En este sentido nace el concepto de biorrefinería como una estructura que integra procesos de conversión de biomasa para producir combustibles, energía y productos químicos. Al originar múltiples productos, una biorrefinería aprovecha los varios componentes de biomasa y sus intermediarios, por lo tanto, maximiza el valor derivado de ésta utilizada como materia prima [1,5]. La mazorca de maíz está compuesta mayoritariamente por celulosa, lignina y hemicelulosas, suponiendo estos tres el 90% de la biomasa, y estando también presentes en pequeñas cantidades proteínas, pectinas, compuestos fenólicos y otro tipo de componentes menores [6]. Por lo que en la biorrefinería de la mazorca de maíz se obtiene principalmente celulosa

que es una materia prima ideal para obtener azúcares fermentables; lignina que puede emplearse para producir resinas fenólicas, dispersantes, aglutinantes y fibras de carbono; y por último en menor medida, compuestos bioactivos entre los cuales se encuentran los compuestos fenólicos [5]. Estos últimos son compuestos que suelen ser recuperados por extracción con disolventes polares y no polares antes de utilizarse el residuo para otros fines.

El interés recuperación de los compuestos fenólicos (o polifenoles) es debido a que son un grupo de sustancias bioactivas que están siendo utilizadas como ingredientes funcionales en la elaboración de alimentos más saludables, así como ha aumentado en los últimos años su uso en para la elaboración de distintos productos en la industria farmacéutica y cosmética. Esto es debido a sus diversas actividades biológicas, como por ejemplo la antioxidante, ya que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de atrapar radicales libres donadores de átomos de hidrógeno o electrones, por lo que podrían actuar como alternativa de los antioxidantes sintéticos. En la bibliografía ya hay muchos artículos que estudian la recuperación de polifenoles y flavonoides a partir de residuos vegetales como pieles de cebolla, en bagazo de cerveza y hojas de olivo [7,8,9]. Sin embargo, los residuos de mazorca de maíz no están todavía muy estudiados, pero se destacan como una materia prima para obtener distintos tipos de polifenoles, tales como el ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico y resveratrol y los derivados de estos; flavonoides como quercetina, hesperidina y kaempferol; y en baja concentración diferentes tipos de antocianos [10,11,12].

Dado que los polifenoles en los residuos de mazorca de maíz se encuentran en el interior de las células vegetales, es necesario emplear un proceso de extracción eficiente para conseguir que su liberación al disolvente sea rápida y con un rendimiento suficientemente elevado. La extracción sólido-líquido se basa en que el disolvente penetra a través de los poros del sólido, entrando así en su interior. De esta manera, los compuestos de interés que se desean extraer se disuelven en el líquido [13]. En la extracción de polifenoles para aplicaciones alimentarias, los disolventes más frecuentes son el agua, etanol y mezclas de ambos [14]. El proceso convencional de extracción suele realizarse en baños con agitación, siendo esta la técnica más tradicional, conocida como maceración. En cuanto al tiempo de extracción para residuos de mazorca de maíz suele oscilar entre los 5 min y 24 h [13].

Como técnica alternativa, la extracción asistida con ultrasonidos ha resultado ser eficiente para disminuir los tiempos de extracción, debido a los efectos de cavitación. Este fenómeno aumenta la difusión de los compuestos que se desean extraer debido a que se generan zonas de enrarecimiento a altas temperaturas y presiones y roturas en la superficie del material, lo cual hace que aumente la velocidad de transferencia de materia, así como la porosidad del material sólido [15,16]. La extracción con ultrasonidos aplicada a el residuo en estudio se suele realizar en un intervalo de temperaturas comprendida entre 25-75 °C, con tiempos de extracción mucho menores que en la extracción convencional comprendidos entre 2 y 60 min [15].

Actualmente la técnica de extracción por microondas se destaca como una técnica novedosa, que puede ser más eficaz que la extracción por maceración. La radiación de las microondas es absorbida por las moléculas del disolvente provocando su excitación, lo cual genera un aumento de la temperatura de extracción. Gracias al aumento de la temperatura y a la energía de las moléculas se mejora el proceso de transferencia de los compuestos de interés. [17, 18]. Este proceso de extracción requiere una optimización no solo del tiempo de extracción, sino también de la temperatura (50-120 °C), de la potencia (100-800 W), del tiempo de rampa de calentamiento y del tiempo de mantenimiento de temperatura constante[19].

2.- OBJECTIVES

The main aim of this work was to evaluate the extraction of phenolic compounds from corncob residues under different extraction conditions, as well as the characterisation of the extracted phenolic fraction. The following specific objectives have also been performed in order to achieve this purpose:

1. The first objective was to study the extraction of phenolic compounds using ethanol as solvent and different corncob residues. The effect of contact time, temperature (40 °C and 70 °C), solid residue to solvent ratio (5 y 10 % (w/v)), and ultrasound-assisted extraction (USAE) on the extraction efficiency were examined.
2. Estimation and comparison of extraction kinetic parameters and identification of the main phenolic compounds extracted.
3. A kinetic study using water and ethanol/water mixtures as solvent under previously selected operating conditions. Comparison of results to assess the effect of the solvent on the diffusion rate and extraction yield.
4. Study of the extraction yield of the phenolic fraction from the solid residue by microwave-assisted extraction at 70°C. Effect of operating conditions and solvent.

3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES

Los residuos de maíz fueron suministrados uno por agricultores de la zona de Aguilar de Campoo y de Saldaña (Palencia). Para el desarrollo del trabajo se ha utilizado etanol absoluto (VWR Chemicals, pureza 100%), agua ultrapura (milli-Q), ácido gálico (Sigma-Aldrich, pureza 99%), Folin Ciocalteu's reagent (VWR Chemicals), carbonato de sodio anhidro (Labkem, pureza 99%), quercetina (Sigma, pureza $\geq 95\%$), acetato de potasio (Merck, pureza 99%), cloruro de aluminio (Acros Organics pureza 98,8%), sulfato de hierro (II) 7-hidrato (Panreac, pureza 98%), acetato de sodio (Merck, pureza 99%), ácido acético glacial (Panreac, pureza 100%), ácido clorhídrico (VWR Chemicals, pureza 37%), 2,4,6-tris.2-pyridyl-s-triazine (TPTZ, TCI, pureza 98%), cloruro de hierro (III) 6-hidrato (Panreac, pureza 97%), amonio acetato (VWR Chemicals, pureza 99,2%), acetonitrilo (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99,8\%$). Todos los reactivos mencionados fueron utilizados sin realizar ningún tratamiento de purificación.

A lo largo del trabajo experimental se ha utilizado un molino de cuchillas (SM 100, Retsch), una balanza (Precisa 125 A), un secadero de bandejas (EDIBON), una centrífuga (Thermo scientific, ST 16R), una microcentrífuga (Thermo scientific, Sorvall Legend Micro 17R), un baño termostático (SELECTA, Ultraterm), un baño de ultrasonidos ($\pm 0,3$ ULTRASON-S-H, J.P. SELECTA), un baño de agitación OLS 200 ($\pm 0,1$ °C, Grant), un extractor microondas (Microwave synthesis Milestone, flexiWAVE), un espectrofotómetro (HITACHI U-2000) y un cromatógrafo HPLC con detector diodo array (Agilent 1100).

3.2.- RESIDUO DE MAZORCA MÁIZ

En este trabajo se han utilizado dos residuos de mazorca de maíz (Fig. 1). En ambos casos, las mazorcas se desgranaron de forma manual y se realizó su molienda empleando un molino SM 100 (Retsch). Posteriormente, el producto molido se tamizó (tamiz 400 mesh) con el objetivo de seleccionar como residuo de mazorca de maíz la fracción con un tamaño inferior a los 400 μm .



Figura 1. Fotografías de los residuos de maíz suministrados por los agricultores de (A) de Saldaña y (B) Aguilar de Campoo y del residuo seco obtenido a partir de cada uno de ellos. Se denomina RM1 y RM2 a los residuos de mazorca triturados y secos empleados en los procesos de extracción.

3.3.-PROCESO DE EXTRACCIÓN

Se ha estudiado el proceso de extracción de la fracción fenólica de los residuos de mazorca RM1 y RM2 mediante un proceso una extracción convencional con agitación rotatoria (AR), asistida por ultrasonidos (EUS) y asistida por microondas (EMW); utilizando como disolventes etanol agua y sus mezclas (50, 70 y 90% vol. etanol).

3.3.1. Extracción convencional en baños agitados con agitación rotatoria (AR)

Todos los experimentos por agitación rotatoria se llevaron a cabo a 40 y 70 °C poniendo en contacto el residuo de mazorca (RM) con el disolvente, en una proporción del 5 y 10% p/v, utilizando un baño de agitación termostático (OLS, 200 Grant) a 120 rpm y con una duración máxima de 30 h. Los disolventes empleados fueron etanol, agua y sus mezclas. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de extracción comprendidos entre 5 min y 30 h para estudiar el efecto del tiempo de contacto en la extracción de los compuestos polifenólicos y flavonoides totales. Las muestras recogidas se centrifugaron (Sorvall Legend Micro 17R centrifuge, Thermo scientific), durante 15 min a 13000 rpm y a 5 °C; mientras que el extracto se centrifugó (ST 16R centrifuge, Thermo scientific) durante 20 minutos a 4500 rpm y a 5 °C. Todos los extractos obtenidos por centrifugación fueron congelados para su posterior análisis.

3.3.2. Extracción asistida con ultrasonidos (EUS)

Los experimentos de extracción se realizaron a 40 °C, poniendo en contacto el residuo de mazorca (RM) con el disolvente, en una proporción del 5 y 10% p/v, utilizando un baño de ultrasonidos con control de temperatura. En estos experimentos se realizaron con etanol como disolvente. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de extracción comprendidos entre 15 min y 4,5 h. Las muestras de extracto se trataron siguiendo el mismo protocolo explicado en el apartado anterior.

3.3.3. Extracción asistida por microondas (EMW)

El estudio de extracción asistida por microondas se llevó a cabo poniendo en contacto el residuo de mazorca (RM) con el disolvente, en una proporción del 5 % p/v utilizando un extractor microondas a 800 W de potencia y manteniendo perfectamente agitada la mezcla. Se evaluó el efecto de las condiciones de operación: rampa de calentamiento hasta 70 °C (t_{rc} = 1, 2, 4 y 6 min) y etapa de mantenimiento de temperatura a 70 °C (t_m = 1, 5, 10 y 30 min). Una vez seleccionadas las condiciones óptimas se analizó el efecto del disolvente, utilizándose etanol, agua y el seleccionado como óptimo en la extracción por maceración

En todos los casos, tras el tratamiento con microondas, el extracto se centrifugo y se almacenó para su análisis como anteriormente se ha descrito en el apartado 3.3.1.

3.4.- MÉTODOS ANALÍTICOS

A continuación, se recogen los métodos analíticos empleados en este trabajo de investigación.

3.4.1. Determinación de la fracción de compuestos fenólicos totales (CPT)

La fracción de CPT se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu [20]. Dicho método está basado en una reacción de óxido-reducción entre el reactivo Folin-Ciocalteu, y los compuestos fenólicos que se encuentran presentes en la muestra, donde el reactivo Folin-Ciocalteu se reduce al oxidar los CPT [21,22]. Esta reacción de óxido-reducción tiene como consecuencia la generación de un complejo de color azul, cuya absorbancia leída a 750 es proporcional a la cantidad de CPT presentes en la muestra. Para la realización de este análisis se toman 100 μ L procedentes del extracto obtenido por los diferentes métodos de extracción, a los cuales se añaden 2,8 mL de agua destilada, 100 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y 2 mL de carbonato sódico (Na_2CO_3) al 7,5% p/v. Se agita vigorosamente y la mezcla de se deja reposar durante 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente, tras la cual, se mide la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro. Para la realización del blanco se sustituyen los 100 μ L por 100 μ L del disolvente utilizado para la extracción. Se elaboró una curva de calibrado para cada disolvente (etanol, agua y sus mezclas) con ácido gálico como patrón.

3.4.2. Determinación de la fracción de compuestos flavonoides totales (CFT)

El método empleado para la determinación de CFT fue el método colorimétrico con cloruro de aluminio [23]. Dicho método se basa en la capacidad del cloruro de aluminio (AlCl_3) para reaccionar con los grupos hidroxilo en posición C3 o C5 y con los grupos ceto en posición C5 de los flavonoides, de tal manera que se forman complejos ácidos coloreados estables. Mediante espectrofotometría se determina la absorción de estos compuestos coloreados a una longitud de onda de 415 nm. La medida de absorbancia es proporcional a la cantidad de CFT de la muestra. Para la determinación se toman 0,5 mL de muestra, a la cual se le va añadiendo 1,5 mL de etanol, 100 μL de acetato potásico 1 M, 100 μL de cloruro de aluminio (AlCl_3) 10% p/v y 2,8 mL de agua destilada. La muestra obtenida se agita y se deja incubar a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se mide la absorbancia de la muestra a 415 nm por espectrofotometría. Para el blanco se sustituyen los 0,5 mL de muestra por el disolvente utilizado en la extracción. También, se realiza un blanco muestra para medir las muestras que presentan color antes de la realización del método. Para ello, se preparó con la muestra y todos los reactivos excepto el cloruro de aluminio (AlCl_3). El valor de esta absorbancia se resta posteriormente al valor total de la muestra. Se realizó una curva de calibrado para cada disolvente con quercetina como patrón.

3.4.3. Cuantificación de compuestos fenólicos

Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se utilizó un HPLC (HPLC-DAD Agilent 1100) con una columna Kinetex (5 μm Biphenyl, 100 \AA , 250 x 4,6 mm). La detección se realizó a 240, 280, 330, 350 y 370 nm, longitudes de onda que son Se seleccionaron estas longitudes de onda porque son el máximo de absorbancia de los compuestos fenólicos y de la mayoría de los flavonoides. La fase móvil A está compuesta por acetato amónico 5 mM en agua con 1% de ácido acético y la fase móvil B por acetato amónico 5 mM en acetonitrilo con 1% de ácido acético, con un gradiente que se indica en la tabla 1 y un tiempo de acondicionamiento (post-time) de 10 min. El flujo de fase móvil total empleado fue 0,8 mL/min y la temperatura de la columna se mantiene a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Tabla 1. Gradiente de la fase móvil en el método de HPLC

t-min	0	7	20	35	55	65	75	80	90
% fase B	2	2	8	10	18	38	65	80	2

Las muestras se filtraron antes de su análisis por HPLC con filtros de jeringa de celulosa regenerada de 0,45 μm de tamaño de poro (Filter-LAB). La cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en la muestra se determinó a través de las curvas de calibrado realizadas con cada uno de los patrones comerciales (Sigma-Aldrich).

3.4.4. Determinación de la capacidad reductora (CR)

Para determinar la capacidad reductora del extracto se empleó el método FRAP [24], que se basa en la capacidad que tiene el reactivo TPTZ en reducir el Fe (III) a Fe (II). Esta reducción tiene como consecuencia la generación de un color violeta en la muestra, pudiéndose medir espectrofotométricamente su absorbancia y siendo esta proporcional a su capacidad reductora. En la realización de este método se toman 30 μL de muestra (la cual estará diluida en caso de ser necesario) y 970 μL de reactivo TPTZ. Este reactivo TPTZ ha de ser reciente y se prepara añadiendo 25 mL de tampón de acetato sódico pH 3,6 (elaborado añadiendo sobre 30 mL de acetato de sodio 0,3 M ácido acético 0,3 M hasta pH 3,6), 2,5 mL de FeCl_3 20 mM reciente (FeCl_3 6-hidrato y agua Mili-Q), 2,5 mL TPTZ reciente 10 mM (TPTZ en HCl 40 mM) y 3 mL de agua Milli-Q. Tras la mezcla resultante de muestra y reactivo TPTZ, se llevó a incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ en un baño termostático (Ultraterm, P SELECTA), donde permaneció durante 0,5 h. Tras la incubación se procedió a la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 593 nm, siendo el autozero el tampón de acetato sódico pH 3,6 y el blanco el

reactivo TPTZ incubado sin muestra. Se realizó una curva de calibrado empleando sulfato de hierro II como patrón.

3.4.5. Determinación de los sólidos totales en el extracto

El contenido de sólidos totales en los extractos finales se determinó utilizando 10 mL de muestra que se secaron en una estufa a 105 ± 1 °C, hasta que el peso de la muestra permaneció constante (48-72 h).

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento de extracción se realizó al menos dos veces y todos los extractos se analizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como valor medio \pm la desviación estándar para poder evaluar el grado de dispersión de todos los experimentos que se han realizado bajo las mismas condiciones de operación y para validar los resultados. Se aplicó el método de diferencias significativas de Fisher, un valor de $p \leq 0,05$ confirman diferencias significativas entre los valores (Statgraphics Centurion 18).

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados experimentales de la extracción de compuestos fenólicos para los dos residuos de mazorca, utilizando distintos procesos de extracción (en tanques agitados, asistida por ultrasonidos y asistida por microondas) y distintas condiciones de operación (temperatura, proporción de sólido, tipo de disolvente y tiempo de contacto).

4.1.- RESULTADOS DE EXTRACCIÓN PARA LOS DOS RESIDUOS DE MAZORCA

Se realizó un estudio preliminar de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y flavonoides totales (CFT) para los dos residuos RM1 y RM2 mostrados Fig.1. Estos primeros experimentos se realizaron mediante extracción asistida con ultrasonidos (EUS) a 40 °C y utilizando etanol como disolvente.

En la Fig.2A se presentan los resultados de la cinética de extracción de CPT y CFT del residuo de mazorca RM2 a 40 °C, con etanol y una carga de sólido del 10% p/v. Se observa que a medida que aumenta el tiempo de contacto también lo hace la fracción de CPT y CFT en el extracto, hasta alcanzar un valor constante de 502 ± 11 mg CPT/kg ss y de 279 ± 3 mg CFT/kg ss a partir de los 120 min de ultrasonificación. Esto se justifica debido a que los valores de extracción a tiempos de 120 y 180 min fueron significativamente iguales ($p > 0,05$). Esto indica que el tiempo de ultrasonidos es un factor limitante en el proceso de recuperación de compuestos fenólicos del residuo de mazorca. Se requieren tiempos de ultrasonificación de al menos 120 min para lograr una buena recuperación de la fracción polifenólica presente en dicho residuo. Este resultado es igual al tiempo de ultrasonificación utilizado en otro estudio donde se evalúa la capacidad antioxidante del maíz, ya que se logra la extracción máxima a los 120 min [10].

En la Fig.2B se muestra la comparación de resultados de extracción a los 60 min de ultrasonificación para una concentración de residuo en el extractor del 5 y 10 % p/v utilizando los dos residuos sólidos (RM1 y RM2). La extracción de CPT y CFT ha resultado ser mucho mayor al utilizar el residuo RM1 (1833 ± 31 mg CPT/kg ss para la concentración del 5% y 1628 ± 86 mg CPT/kg ss para la concentración del 10%) en comparación con el residuo RM2 para las dos proporciones de masa de sólido utilizadas. Por otro lado, en la Fig.2B, también se observa que una concentración de sólido del 5% p/v proporciona mejores resultados de extracción para los dos residuos de maíz utilizados. En la bibliografía se ha observado que es habitual utilizar concentraciones de sólido de entorno al 5% p/v o inferior. De hecho, en un estudio de extracción asistido por ultrasonidos emplean una relación masa/volumen de 1/20, lo que equivale a una concentración del sólido del 5% p/v [25]. Otros estudios realizan la extracción empleando 10 g del sólido y 250 mL de extractante, que corresponde a una concentración del sólido del 4% p/v [26] o utilizando concentraciones de sólido entre el 4 y 10% p/v [27].

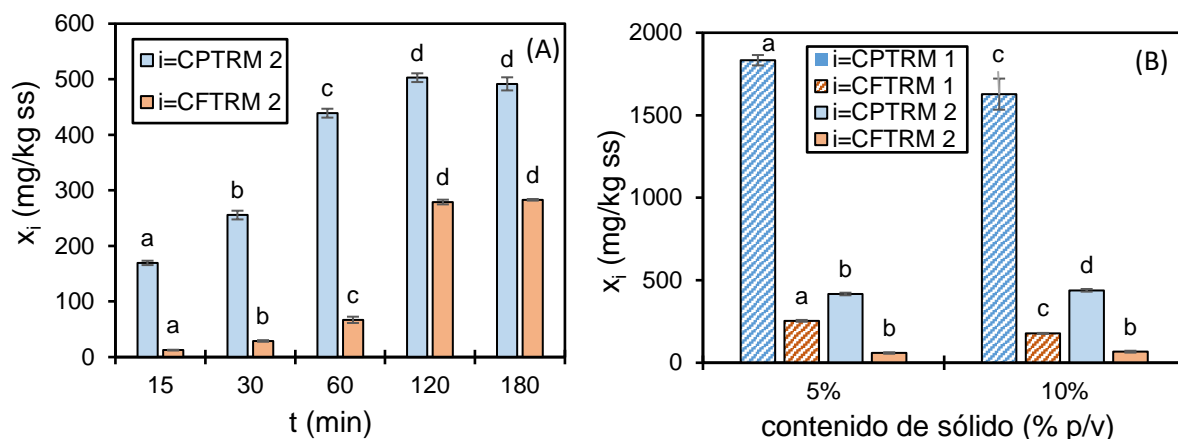


Figura 2. Resultado de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y flavonoides totales (CFT) a 40 °C empleando extracción asistida por ultrasonidos (EUS) con etanol como disolvente. (A) Cinética de extracción con una carga de sólido RM2 del 10% p/v. (B) Comparación de resultados de extracción con un tiempo de contacto de 60 min para distintas cargas de los dos sólidos (RM1 y RM2).

En base a estos resultados se seleccionaron para posteriores experimentos de extracción el residuo RM1 y una concentración de sólido en el extractor del 5% p/v, ya que este residuo en esta concentración proporcionó extractos con un mayor contenido de CPT y de CFT bajo las mismas condiciones de operación.

4.1.1. Identificación de polifenoles y flavonoides en los residuos de mazorca de maíz

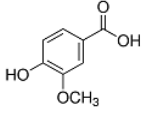
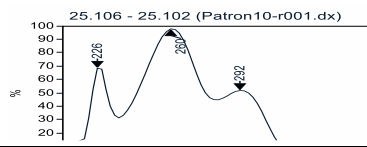
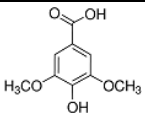
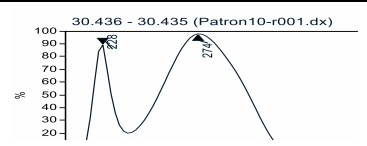
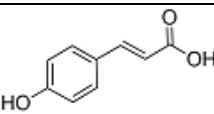
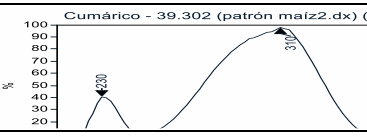
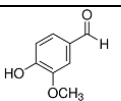
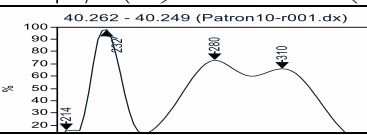
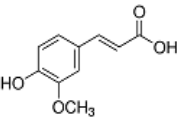
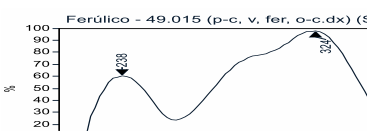
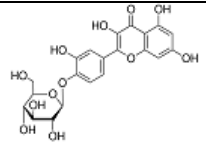
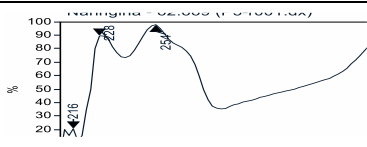
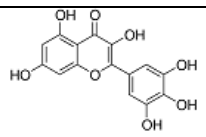
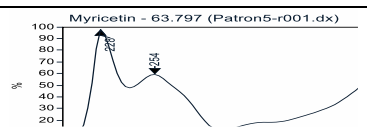
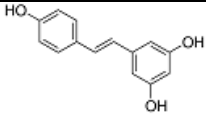
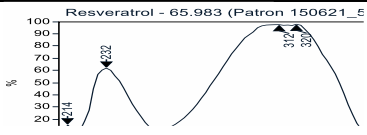
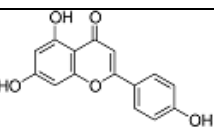
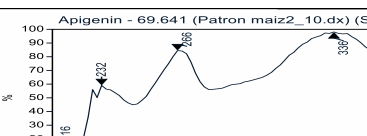
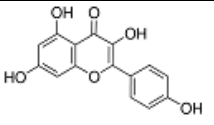
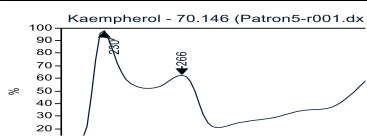
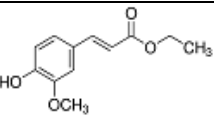

Se realizó una primera identificación de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en los extractos mostrados en la Fig.2B (60 min de ultrasonificación en etanol como disolvente y 40 °C). Para ello se realizó una determinación de HPLC de los extractos de ambos residuos de mazorca de maíz.

En cuanto a los compuestos fenólicos, se consiguió identificar ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, vanillina, ácido ferúlico, resveratrol y etil ferulato; estando todos ellos en ambos residuos de mazorca. Por otro lado, los compuestos flavonoides que se logró identificar fueron quercetina 4-glucósido, miricetina, apigenina y kaempherol; estando de nuevo en ambos residuos de maíz. Pese a que tanto en los extractos RM1 y en RM2 están presentes los mismos compuestos, atendiendo a las áreas del cromatograma, se puede comprobar que dichos compuestos están en una mayor cantidad en el RM1. Gran parte de los compuestos identificados también lo fueron en otros estudios en donde también se extrajeron e identificaron CPT [12, 13, 28-32]. Aunque etil ferulato se considera un compuesto fenólico se puede decir que es un fenilpropanol soluble en etanol y derivado del ácido ferúlico [33, 34].

Tabla 2. Compuestos identificados en los extractos de residuo de mazorca de maíz con el método de HPLC.

Compuesto	Tiempo retención (min)	Estructura	Máximo absorbancia	Espectro (210-400 nm)
Ácido Gálico (Acido 3,4,5-trihidroxibenzoico)	5.5	<chem>O=C(O)c1cc(O)c(O)c(O)c1</chem>	280	
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	16.5	<chem>O=C(O)c1ccc(O)cc1</chem>	240	

Tabla 2 (Continuación)

Compuesto	Tiempo retención (min)	Estructura	Máximo absorbancia	Espectro (210-400 nm)
Ácido Vanilínico (Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico)	25.5		280	
Ácido siringico (Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico)	30.9		280	
Ácido p-cumárico (Ácido trans-4-hidroxicinámico)	39.9		280	
Vanillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído)	41.1		280	
Ácido ferúlico (Ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico)	49.6		330	
Quercetina 4'-glucósido (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona 4'-glucósido)	62.6		370	
Miricetina (3,3',4',5,5',7-hexahidroxiflavona)	63.8		370	
Resveratrol (5-[(1E)-2-(4-hidroxifenil) etenil]-1,3-benzenodiol)	66.2		330	
Apigenina (4',5,7-trihidroxiflavona)	69.6		330	
Kaempferol (3,4',5,7-tetrahidroxiflavona)	70.1		370	
Etil ferulato (Etil 4-hidroxi-3-metoxicinamato)	71.1		330	

4.2.-COMPARACIÓN DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDO CON ULTRASONIDOS Y EN TANQUES AGITADOS

En este apartado se pretende comprobar las diferencias existentes, en cuanto a nivel de recuperación de CPT y de CFT se refiere, entre la extracción asistida con ultrasonidos (EUS) y la extracción convencional con agitación rotatoria (AR).

La Fig.3A muestra los resultados de cantidad de CPT y de CFT recuperados tras extracción convencional con agitación rotatoria (AR) a 40 °C a lo largo del tiempo, utilizando como disolvente etanol y una concentración de sólido RM1 del 5% p/v. Como se puede observar, tanto la extracción de CPT como la de CFT mediante AR sigue una tendencia ascendente a medida que aumenta el tiempo de extracción, lográndose el máximo de recuperación a los 1800 min. Por lo que de nuevo se vuelve a comprobar el efecto del tiempo.

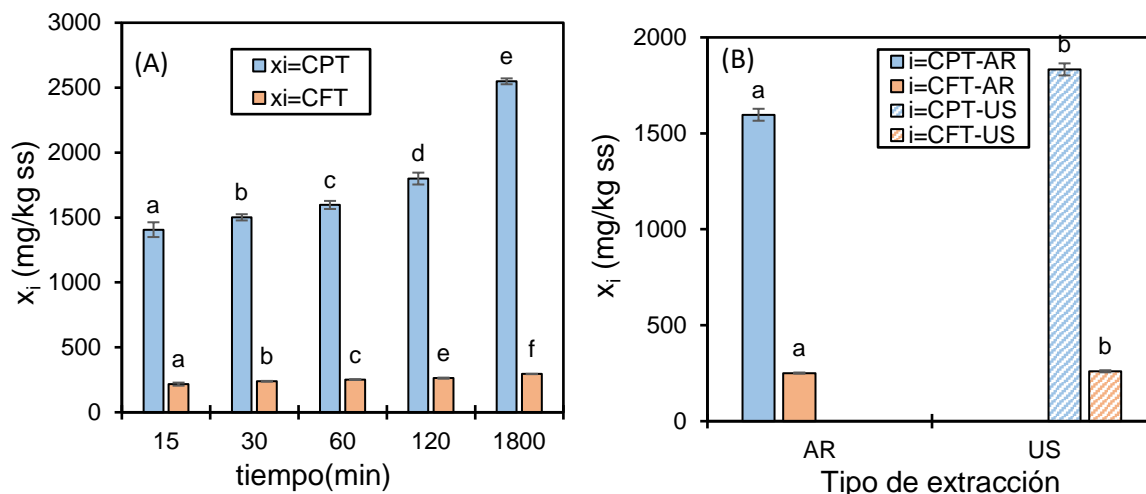


Figura 3. Resultado de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y flavonoides totales (CFT) a 40 °C empleando extracción convencional con agitación (AR) y extracción asistida por ultrasonidos (EUS) con una carga de sólido RM2 del 5% p/v y etanol como disolvente. (A) Cinética de extracción mediante AR. (B) Comparación de resultados de EUS y AR con un tiempo de contacto de 60 min.

Por otro lado, en la Fig.3B, se expone la comparación de resultados de extracción a 40 °C de EUS y AR a un tiempo de contacto de 60 min y con una carga de sólido RM1 del 5% p/v en etanol. Respecto a los CPT, se puede observar que a los 60 min se consigue una mayor extracción gracias al empleo de EUS, obteniendo una cantidad de 1833 ± 31 mg CPT/kg ss frente a los 1597 ± 31 mg CPT/kg ss obtenidos a través de AR; siendo esta una diferencia significativa ($p < 0,05$). A su vez también se aprecia que a los 60 min con EUS se obtiene una cantidad significativamente igual ($p > 0,05$) que la extraída mediante AR durante 120 min (1800 ± 46 mg CPF/kg ss). A pesar de que la extracción mediante EUS a los 60 min es inferior a la obtenida mediante AR durante 1800 min, esta corresponde aproximadamente al 70% de la extracción con AR a los 1800 min.

La extracción de CFT sigue un comportamiento igual que el de los CPT, debido a que a los 60 min se obtiene una extracción de 261 ± 2 mg CFT/kg ss mediante EUS por los 251 ± 2 mg CFT/kg ss, siendo estos dos valores significativamente distintos ($p < 0,05$). Por otra parte, la cantidad de flavonoides extraídos a los 60 min mediante EUS es significativamente igual ($p > 0,05$) a la extraída a los 120 min mediante AR (262 ± 3 mg CFT/kg ss).

Así podemos ver que la extracción en EUS parece más eficiente que la convencional en baños agitados, probablemente por el aumento de la velocidad de difusión por el fenómeno de cavitación fenómeno de cavitación mediante el cual se provoca la generación de burbujas en el sistema durante la extracción. Gracias a que se generan corrientes de cavitación se produce una mayor fragmentación de las células, lo cual hace que aumente la transferencia entre el

sólido del residuo del maíz y el disolvente ya que estas corrientes ayudan a provocar la ruptura celular [25,32].

Pese a que la extracción en baño asistida por ultrasonidos resulta ser más efectiva que la convencional se desestimará el uso de esta primera para el resto del estudio debido a la dificultad de mantener la temperatura a un valor constante durante el periodo de extracción.

4.3.- RESULTADOS EN LA EXTRACCIÓN EN TANQUES AGITADOS

En este apartado se expondrán los resultados obtenidos a través de la extracción convencional en tanques agitados con agitación rotatoria, donde se estudiará el efecto de la temperatura y del disolvente y se realizará un estudio cinético.

4.3.1. Estudio del efecto de la temperatura

En primer lugar, a la hora de realizar la extracción convencional, se quiso estudiar si la temperatura influye a la hora de realizar la extracción. Por ello en la próxima figura (Fig.4) se representan las cinéticas de extracción convencional con agitación rotatoria (AR) a temperaturas de 40 y 70°C, utilizando el RM1 en una concentración del 5% p/v y empleando como disolvente etanol.

Como se puede comprobar (Fig.4) empleando una temperatura de 70 °C se consigue una mayor extracción, viéndose esta aumentada con el transcurso del tiempo; tal y como ya se observó anteriormente. En el caso de los CPT se observa que, desde los primeros minutos de la cinética, la extracción es significativamente mayor a la temperatura de 70°C respecto a la de 40 °C. En cambio, en el caso de los CFT, se obtienen valores de extracción significativamente iguales o muy parecidos para ambas temperaturas, pero a medida que avanza el tiempo (a partir del min 30) estas se van diferenciando, obteniéndose de nuevo extracciones significativamente mayores a favor de la temperatura de 70 °C.

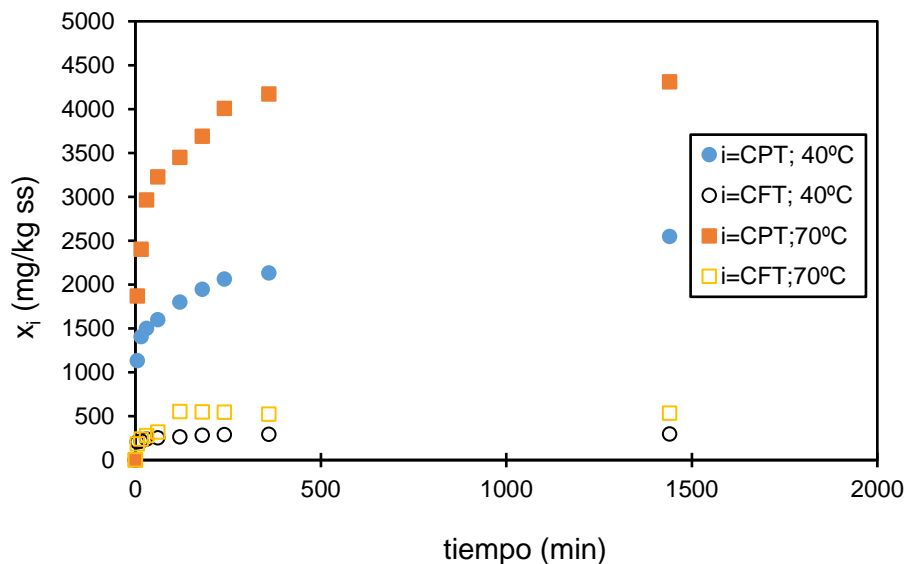


Figura 4. Resultados de la cinética de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y de compuestos flavonoides totales (CFT) mediante extracción convencional con agitación rotatoria en etanol a temperaturas de 40 y 70 °C empleando una concentración de sólido RM1 del 5% p/v.

A continuación, se utilizó un modelo cinético de segundo orden para ajustar los datos experimentales en las cinéticas de extracción [35] [36] correspondientes a las extracciones representadas en la Fig.4.

$$\frac{dx}{dt} = h * (X_{\infty} - X)^2 \quad [1]$$

En Ec. 1, el parámetro h representa a una constante cinética del proceso de extracción, X_{∞} corresponde a la fracción en peso de CPT o CFT liberados en la saturación o en el estado estacionario y X hace referencia la extracción en cada momento de la cinética. Mediante la integración de Ec.1, bajo los límites de integración de $X=0$ para $t=0$ y X para cualquier tiempo t , se obtiene la Ec. 2:

$$X = X_{\infty} - \frac{X_{\infty}}{1+h*t*X_{\infty}} \quad [2]$$

Linealizando la Ec 2 se obtiene Ec. 3:

$$\frac{t}{X} = \frac{1}{X_{\infty}} t + \frac{1}{h*X_{\infty}} \quad [3]$$

El modelo lineal, Ec. 3, se empleó para el cálculo del coeficiente h y del parámetro X_{∞} . En la siguiente figura (Fig.5) se representa t/X frente al tiempo. Gracias al valor de la pendiente se pudo calcular " X_{∞} " (es el inverso); y gracias al valor correspondiente a la ordenada en el origen se calcula h (es el inverso del producto de la ordenada en el origen por X_{∞}^2). En la tabla (tabla 3) se mostrarán los valores de R^2 , h y X_{∞} .

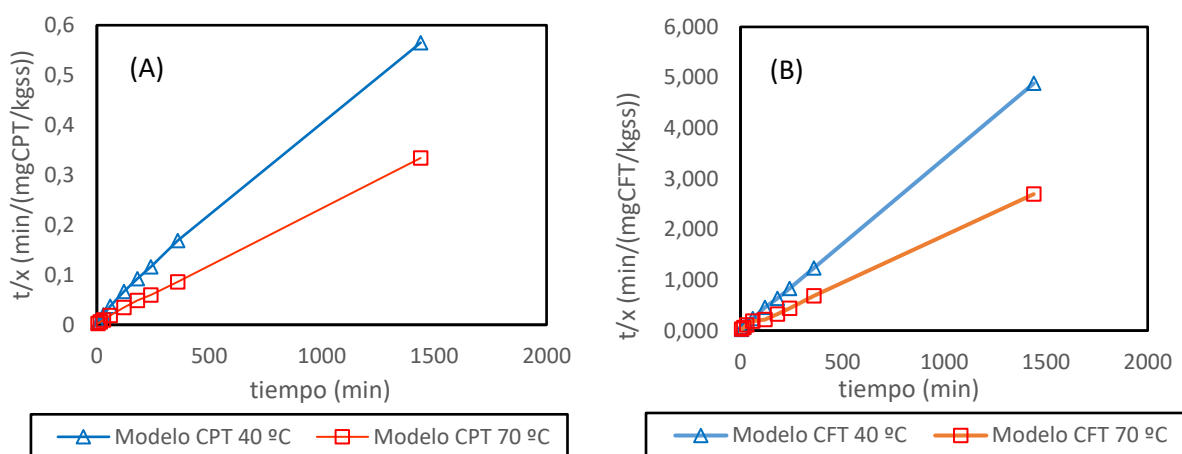


Figura 5. Modelos cinéticos de extracción convencional con agitación rotatoria a 40 y 70 °C en etanol empleando una carga de sólido RM1 del 5% p/v. (A)Modelo cinético de compuestos fenólicos totales (CPT). (B) Modelo cinético de compuestos flavonoides totales (CFT).

Como podemos observar (Tabla 3) todos los modelos se ajustan bastante bien debido a que presentan un valor de R^2 muy elevado, siendo este siempre superior a 0,950. Respecto a los CPT podemos ver como la velocidad de extracción es superior empleando una temperatura de 70°C, debido a que la constante cinética (h) es mayor en comparación a la constante correspondiente a los 40 °C. Lo mismo ocurre en el caso de los CFT. También podemos observar que la velocidad de extracción de los CFT es superior a la de los CPT.

Tabla 3. Coeficientes cinéticos calculados a partir de la Ec.3 para los modelos cinéticos de extracción convencional con agitación rotatoria a 40 y 70 °C con etanol puro como usando una concentración de sólido RM1 del 5% p/v.

Temperatura (°C)	Fracción extraída	h x (mg $x_i/(kgss*min)$)	X_{∞_i} x (mg/kg ss)	R^2
40	CPT	9,859 E-06	2590,673	0,977
	CFT	7,528 E-04	296,472	0,999
70	CPT	1,186 E-05	4366,812	0,999
	CFT	7,733 E-04	540,832	0,998

4.3.2. Estudio del efecto del disolvente

Una vez observado que el efecto de la temperatura es un parámetro a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo una extracción se procede a comprobar el efecto del disolvente. Para ello se utilizará etanol, agua y distintas mezclas etanol-agua (50, 70 y 90% etanol).

Los experimentos se realizaron en baños con agitación rotatoria a 70 °C utilizando una carga de sólido RM1 del 5% p/v y empleando los disolventes mencionados anteriormente. Los resultados de las cinéticas de extracción de CPT y CFT se muestran a continuación en las siguientes figuras (Fig.6 y Fig.7).

En la Fig.6 se representan las cinéticas de extracción de CPT bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Se observa una clara diferencia en cuanto a cantidad de CPT recuperados en función del disolvente empleado. Parece evidente que la utilización de las mezclas etanol-agua resultaron mucho más efectivas que el uso de soluciones puras debido a que con estas últimas se obtienen las extracciones más bajas. De este modo, una vez llegadas a las 30 h, se puede llegar a extraer hasta 3,21 veces más de CPT utilizando las mezclas etanol-agua (10102 ± 31 mg CPT/kg ss con 70% etanol frente a los 3140 ± 14 mg CPT/kg ss con 100% agua).

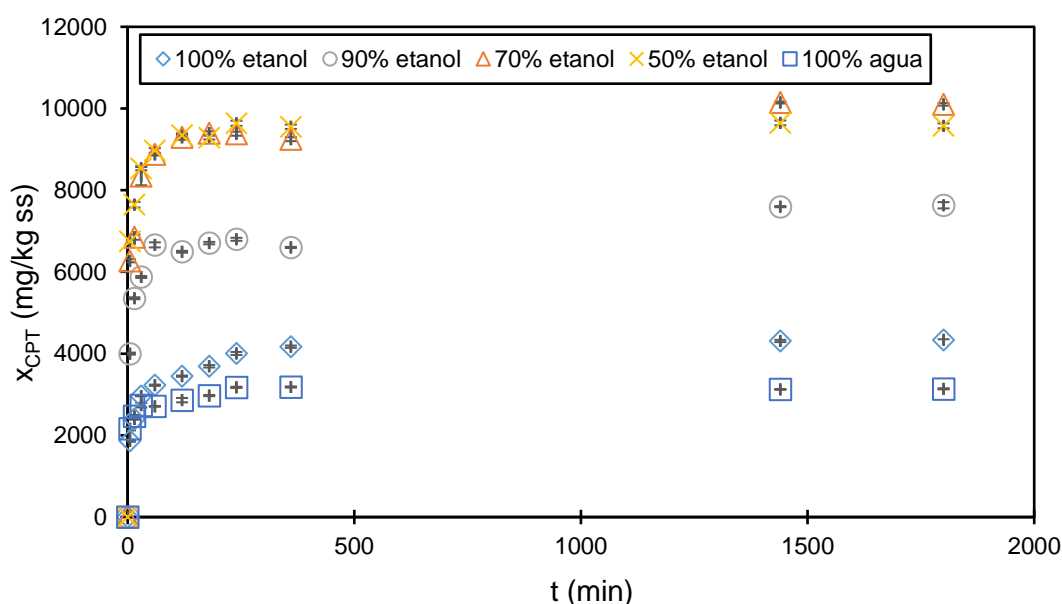


Figura 6. Resultados de las cinéticas de extracción de CPT a través de extracción convencional con agitación rotatoria a 70 °C con una concentración de sólido RM1 del 5% p/v utilizando como disolvente etanol, agua y sus mezclas.

La cinética de extracción de los CFT se muestra en la Fig.7, donde de nuevo la cantidad de flavonoides recuperados se ve influenciada por el tipo de disolvente. Al igual que ocurre con los CPT, con el uso de los disolventes puros se vuelve a lograr las extracciones más bajas; por lo que las mezclas etanol-agua resultan ser más eficaces de nuevo que el uso de disolventes puros. En este caso la extracción máxima de CFT empleando una mezcla como disolvente fue de 1431 ± 11 mg CFT/kg ss (con 70% etanol) mientras que la mínima utilizando un disolvente puro fue de 370 ± 2 mg CFT/kg ss (con 100% agua), lo que supone una extracción 3,87 veces menor.

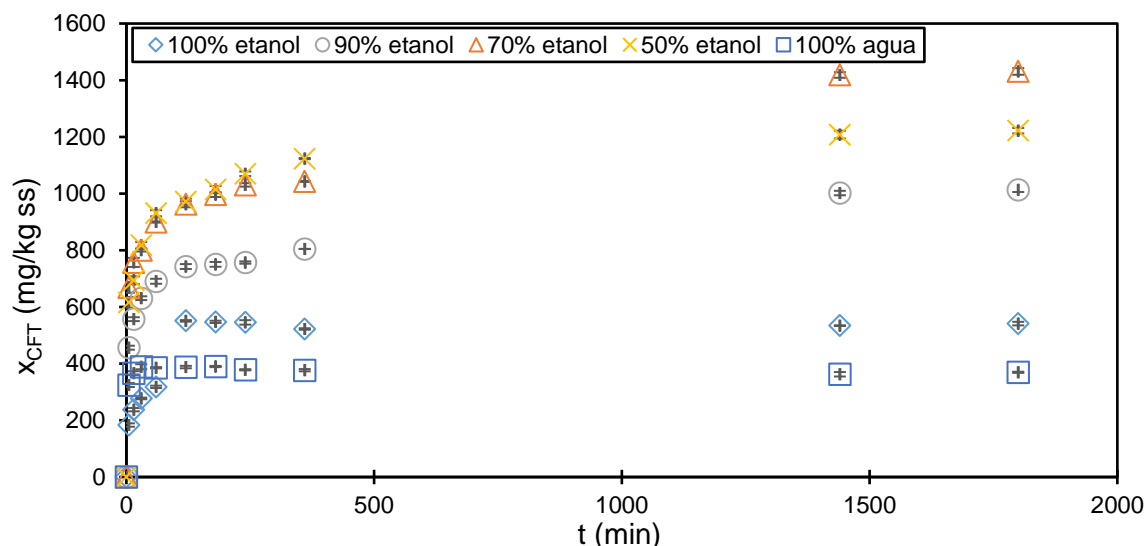


Figura 7. Resultados de las cinéticas de extracción de CFT a través de extracción convencional con agitación rotatoria a 70 °C con una concentración de sólido RM1 del 5% p/v utilizando como disolvente etanol, agua y sus mezclas.

Observando simultáneamente ambas cinéticas, se comprobó las mezclas etanol-agua proporcionan unos mejores valores de extracción de CPT y CFT que las disoluciones puras bajo las mismas condiciones de operación. También se observó que la extracción mediante etanol puro fue mejor que a través del disolvente 100% agua. Dentro de las mezclas etanol-agua, la mezcla 90% etanol resultó ser la menos efectiva a la hora de la extracción, mientras que con la utilización de mezclas 70 y 50 % etanol se obtuvieron resultados parecidos, aunque siempre la mayor extracción se consiguió con el disolvente 70% etanol. Estos resultados indican que un cambio de polaridad del disolvente afecta a los resultados de extracción para este tipo de residuo sólido, resultando la más óptima entre las ensayadas la del 70% etanol con un 30% agua. Destacar que, independientemente el tipo de disolvente que se utilice, la mayor parte la extracción se produce en los primeros minutos, ya que una vez alcanzada la hora se logra extraer entre el 75 y el 92% de los CPT y entre el 59 y el 86 % de los CFT. Decir también que una vez alcanzadas las 24 h parece completarse la extracción tanto de CPT como de CFT, debido a que no existe diferencias significativas entre las determinaciones de CPT y CFT correspondientes a las 24 h de extracción y a las 30 h (extracto final).

Los resultados en cuanto a la influencia del disolvente resultaron ser coherentes debido a que al emplear mezclas etanol agua se logra modificar la polaridad del disolvente haciendo que aumente la selectividad en comparación con el agua pura y el etanol puro [5, 11, 13].

Al igual que se hizo anteriormente se va a emplear un modelo cinético de segundo orden para ajustar los datos experimentales en las cinéticas de extracción, pero esta vez correspondientes a las extracciones correspondientes a las mostradas en Fig.6 y Fig. 7. Mediante la Ec.3 se pudo calcular, como ya se explicó, los parámetros R^2 , h y X_{∞} , cuyos valores se exponen a continuación (Tabla 4).

Como se aprecia (Tabla 4) el modelo vuelve a ajustarse bastante bien ya que los valores de R^2 son muy altos, siendo estos iguales o superiores a 0,990. Respecto a los CPT, las mayores velocidades de extracción se obtuvieron cuando se empleó como disolvente agua y la mezcla 50% etanol. Al usar como disolvente la mezcla 70% etanol se vio que la velocidad de extracción obtenida fue la más baja, aunque también es con el que se logró la mayor cantidad de CPT extraídos. En cuanto a los CFT las mayores velocidades de extracción se lograron mediante los disolventes puros de etanol y agua, aunque también sus extracciones finales fueron las menores. En cambio, esta vez es con la mezcla 50% etanol con la que se consiguió una menor velocidad de extracción de CFT.

Tabla 4. Coeficientes cinéticos calculados a partir de la Ec.3 para las extracciones en baño con agitación rotatoria a 70 °C empleando distintas proporciones etanol-agua.

Disolvente	Fracción extraída	h x (mg x _i /(kgss*min))	X [∞] _i x (mg/kg ss)	R ²
100% etanol	CPT	1,186 E-05	4366,812	0,999
	CFT	7,733 E-04	540,832	0,998
90% etanol	CPT	7,024 E-06	7633,587	0,998
	CFT	2,412 E-05	1015,228	0,995
70% etanol	CPT	7,628 E-06	10204,0816	0,999
	CFT	1,317 E-05	1440,922	0,990
50% etanol	CPT	2,581 E-05	9708,738	0,999
	CFT	3,371 E-05	1221,001	0,999
100% agua	CPT	7,057 E-05	3134,796	0,999
	CFT	4,670 E-04	362,056	0,999

4.3.3. Caracterización del extracto final

Para tratar de identificar y cuantificar los CPT y los CFT presentes en RM1 se realizó un análisis HPLC de los extractos finales obtenidos a partir de las extracciones convencionales con agitación rotatoria a 70 °C con una concentración de sólido RM1 del 5% p/v y empleando los disolventes 100% etanol, 70% etanol y 100% agua.

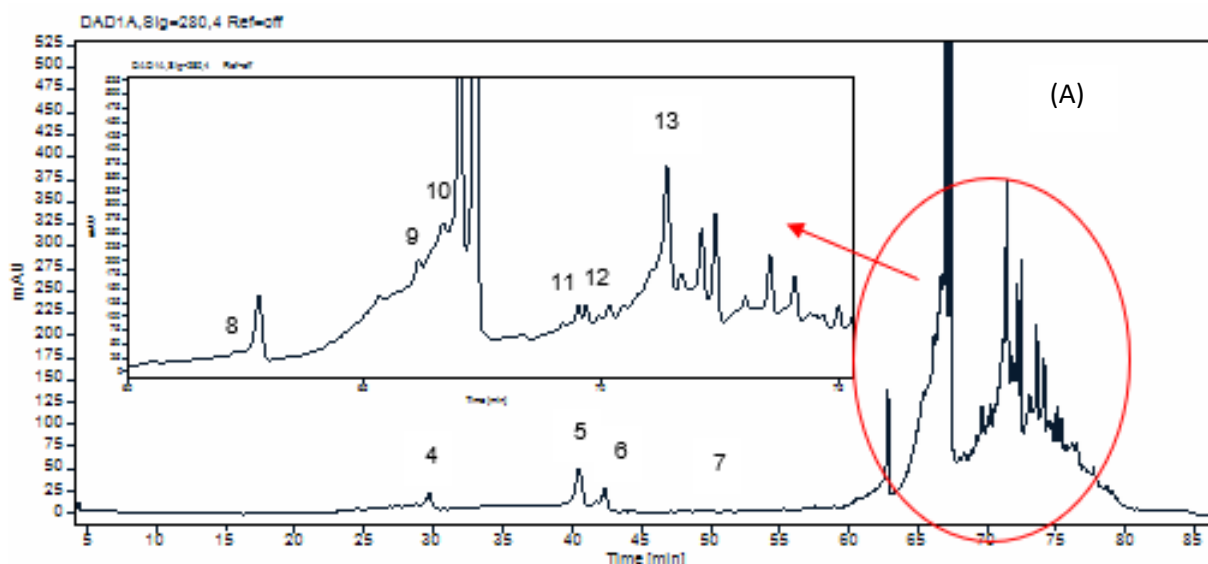


Figura 8. Cromatogramas correspondientes a las extracciones convencionales con agitación rotatoria a 70°C con una concentración de sólido RM1 del 5% p/v, utilizando como disolvente (A) 100% etanol (B) mezcla etanol-agua 70% etanol y (C) 100% agua.

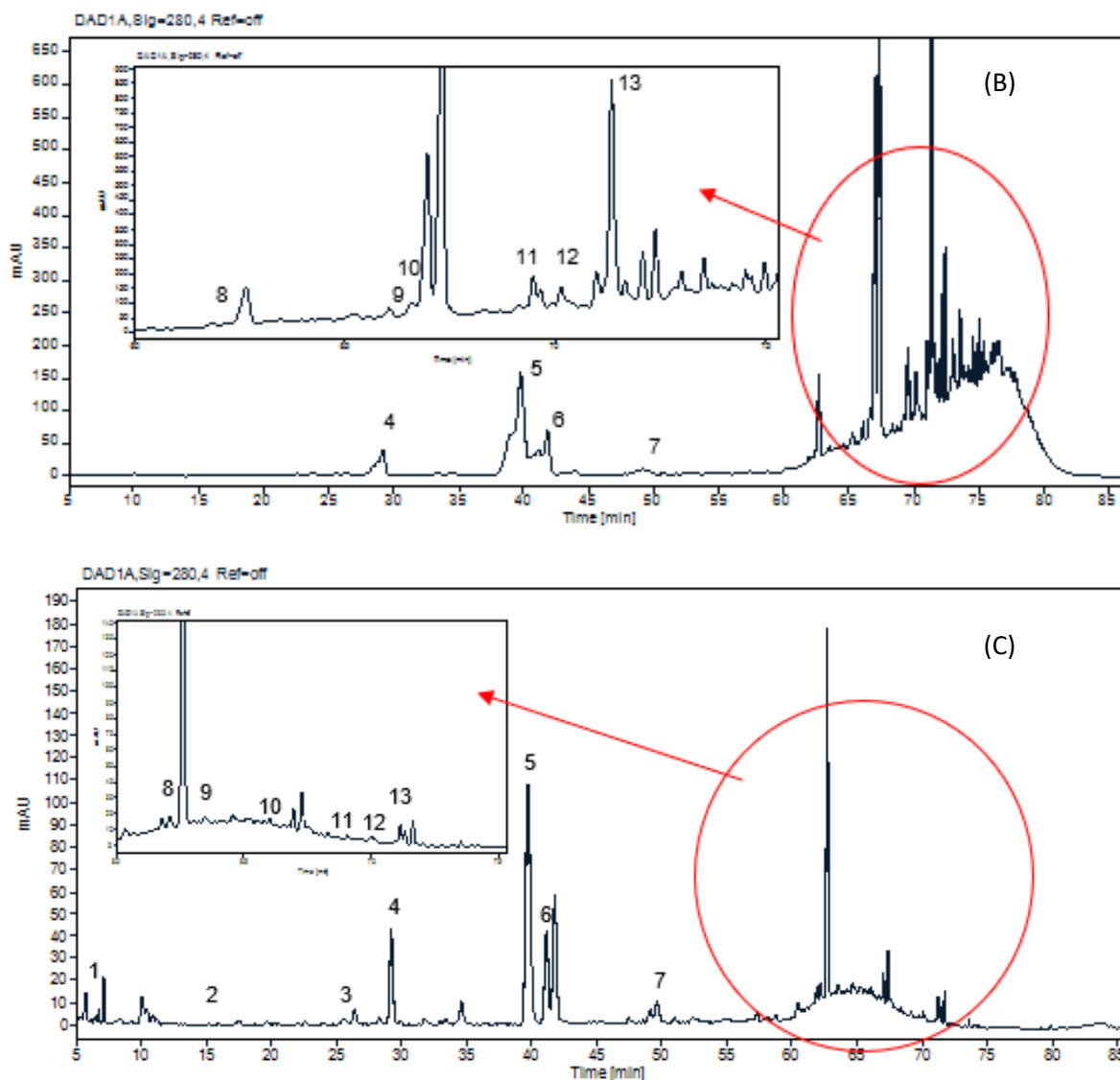


Figura 8 (Continuación)

A continuación (Tabla 5) se muestran la concentración de los compuestos fenólicos que se identifican por HPLC en los extractos de las extracciones mencionados anteriormente. La concentración se ha calculado a partir de las curvas de calibrado a 280 nm de cada compuesto individual teniendo en cuenta el área de cada pico correspondiente, excepto quercetina 4-glucósido que se cuantificó a partir de la curva de calibrado de 370 nm, donde tiene su máximo de absorción.

Tabla 5 Resultados de cuantificación de polifenoles y flavonoides totales en los extractos finales obtenidos en un proceso de extracción con agitación rotatoria a 70°C con una carga de sólido RM1 del 5% p/v utilizando como disolvente etanol 100% etanol, la mezcla etanol-agua 70% de etanol y 100% agua.

Compuesto	Nº en el cromatograma	100% etanol x (mg/kg ss)	70% etanol x (mg/kg ss)	100% agua x (mg/kg ss)
Ácido gálico	1	n.d.	n.d.	10 ± 1
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	2	n.d.	n.d.	6 ± 1
Ácido vanilínico	3	n.d.	n.d.	27,20 ± 4

Continuación **Tabla 5**

Compuesto	Nº en el cromatograma	100% etanol x (mg/kg ss)	70% etanol x (mg/kg ss)	100% agua x (mg/kg ss)
Ácido siríngico	4	28 ± 3	104 ± 7	106 ± 2
Ácido <i>p</i> -cumárico	5	46 ± 3	785,8 ± 2	231 ± 4
Vanillina	6	12 ± 1	124,2 ± 8	93,3 ± 0,6
Ácido ferúlico	7	1,5 ± 0,4	12 ± 2	29,10 ± 0,08
Quercetina 4-glucósido	8	76 ± 4	181 ± 2	130 ± 9
Miricetina	9	2,1 ± 0,2	11 ± 2	7 ± 1
Resveratrol	10	11 ± 1	20 ± 3	1,60 ± 0,06
Apigenina	11	15 ± 2	55 ± 3	2,30 ± 0,07
Kaempherol	12	23 ± 2	99 ± 8	4,1 ± 0,3
Etil ferulato	13	190 ± 6	925 ± 54	5,3 ± 0,7
CPT		4338 ± 14	10102 ± 31	3140 ± 14
CFT		541 ± 27	1431 ± 11	370 ± 2
FRAP		37 ± 1	141 ± 3	26,7 ± 0,6
Sólidos totales		59257 ± 266	50611 ± 986	87515 ± 779

*No detectado (n.d.)

Como se puede apreciar (Tabla 5) los compuestos obtenidos mediante el empleo como disolvente de etanol puro y de la mezcla-etanol agua al 70% son los mismos. Cuando se utiliza 100% agua como disolvente se extrae además ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido vanilínico. Los únicos compuestos flavonoides que se lograron identificar y cuantificar fueron la quercetina 4-glucósido, miricetina, apigenina y kaempherol. En los extractos obtenidos mediante el empleo de 100% etanol y 70% etanol como disolvente el compuesto fenólico que se encuentra en mayor cantidad es etil ferulato, el cual representa la mayoría absoluta de la cantidad de fenoles cuantificados. El ácido *p*-cumárico y ácido siríngico son los compuestos que en mayor cantidad se encuentran tras etilferulato; y el flavonoide que se encontró en mayor cantidad fue quercetina 4-glucósido. En cambio, atendiendo a la extracción en la que se empleó a 100% agua, etil ferulato pasa a ser a uno de los compuestos fenólicos que menos se logra extraer, siendo ácido *p*-cumárico, quercetina 4-glucósido y ácido siríngico los compuestos que se encuentran en mayor cantidad.

También se procedió a obtener los sólidos totales (ST) de cada uno de los extractos finales obtenidos tras las 30 h mediante AR. Para ello de cada extracto final se tomaron 10 ml, se pesaron y se introdujeron en una estufa durante 48 h para obtener así los ST. Con ellos y junto a la cantidad de CPT obtenidos en el extracto final, se pudo calcular el índice de pureza, ya que su determinación se obtiene gracias a la relación de la concentración de ST (mg ST/kg ss) entre la concentración de CPT (mg CPT/kg ss) presentes en el extracto final por cien. Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

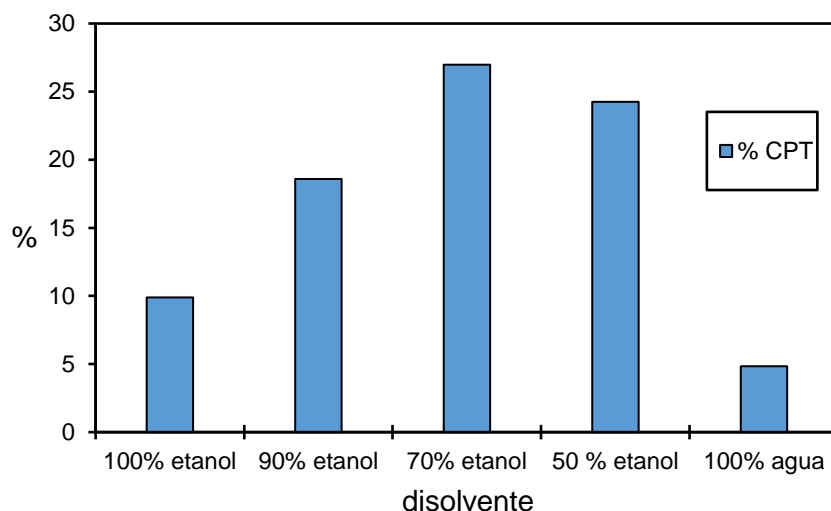


Figura 9. Representación de la cantidad de CPT (%) respecto a los sólidos totales de los extractos obtenidos mediante AR a 70 °C con una carga de sólido RM1 del 5% p/v y empleando como disolventes etanol, agua y sus mezclas.

En la Fig. 9 se muestran los porcentajes de CPT respecto a la cantidad de sólidos totales de los extractos obtenidos mediante AR a 70 °C con una carga de sólido RM1 del 5% p/v y empleando como disolventes etanol, agua y sus mezclas.

Como se puede apreciar el % de CPT más bajo corresponde al extracto obtenido con 100% agua como disolvente, seguido del extracto correspondiente al disolvente de 100% etanol. Los extractos de las mezclas etanol-agua presentan valores más porcentaje de CPT, siendo la mezcla 70% con la que mayor cantidad se obtiene. La explicación a estos resultados se debe que los CPT se encuentran adheridos a las cadenas de xilosa de la célula. Al emplear solo agua como disolvente se produce la ruptura de esta cadena liberándose así los CPT, pero como consecuencia también se liberan muchos azúcares, los cuales también se obtendrán en la extracción y hacen que el porcentaje de CPT sea el más bajo. En cambio, el etanol es capaz de que los CPT se disuelvan en él sin provocar la ruptura de la cadena de xilosa, por lo que los azúcares no son liberados obteniéndose así un porcentaje mayor de CPT en comparación con el uso agua pura. A la vista de los resultados, mediante la combinación de etanol-agua, se pueden lograr mayores porcentajes de CPT respecto a los sólidos totales.

4.2.4. Correlación con capacidad reductora

Finalmente se procedió a evaluar la correlación entre la capacidad reductora del extracto con los CPT y con los CFT. Para ello se utilizaron los extractos procedentes de las extracciones mediante AR a 70°C con una carga de sólido de 5% p/v y empleando como disolventes 100% etanol, 70% etanol y 100% agua. Se determinó su capacidad reductora de dichos extractos mediante el método FRAP, expresándose en mM FeSO₄ por kg de sólido seco. A continuación, se representó la concentración de CPT y de CFT frente a las medidas de FRAP obteniéndose así unas líneas de tendencia, cuyo R² nos indica la correlación existente (a mayor valor de R² mayor correlación). En la siguiente tabla se exponen los valores de R² obtenidos.

Como se puede comprobar (Tabla 6) al emplear 100% agua como disolvente obtenemos una muy mala correlación (tanto CPT como CFT) con la capacidad reductora del extracto. Esto puede deberse a que CPT representan un porcentaje bajo respecto a los sólidos totales, lo cual indica que hay muchas otras sustancias que podrían afectar a la capacidad reductora. Cuando el disolvente es la mezcla 70% etanol podemos ver que son los flavonoides los que influyen más en la capacidad reductora. Esto es debido a que gracias a este disolvente se

logró extraer una cantidad lo suficientemente considerable de CFT, como por ejemplo quercetin 4-glucósido, miricetina, apigenina y kaempherol. Finalmente, con el empleo de 100% etanol vemos que la capacidad reductora se relaciona muy bien con los CPT, debido a que se logró extraer una mayor cantidad de estos compuestos y no tantos de flavonoides.

Tabla 6. Valores de R^2 en las correlaciones de CPT y CFT con la capacidad reductora en los extractos obtenidos mediante baño con agitación rotatoria a 70°C empleando como disolventes 100% etanol, 70% etanol y 100% agua.

Disolvente	Fracción	R^2
100% etanol	CPT	0,9914
	CFT	0,8008
70% etanol	CPT	0,8645
	CFT	0,9928
100% agua	CPT	0,8049
	CFT	0,8774

4.4.- EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS

Para concluir con el estudio se procedió a realizar la extracción mediante la asistencia de microondas, con el objetivo de comprobar si esta nueva variante resulta ser más efectiva y eficiente. En el proceso de extracción asistida por microondas diferenciaremos tres etapas. La primera es la rampa de calentamiento y hace referencia al tiempo para que se alcance a temperatura programada; la segunda es la etapa mantenimiento y corresponde al tiempo durante el cual se mantiene la temperatura programada; y finalmente una etapa de enfriado, que corresponde al tiempo necesario para que el extracto disminuya su temperatura y que su retirada del equipo sea segura.

4.4.1. Tiempos de operación del EMW

En primer lugar, los experimentos con microondas fueron encaminados en la búsqueda de los tiempos óptimos de rampa de calentamiento (t_{rc}) y de mantenimiento de temperatura (t_m), para posteriormente aplicarlos en la extracción utilizando distintos disolventes.

En la Fig.10 se representan las extracciones obtenidas mediante EMW a 70 °C con una concentración de sólido RM1 del 5% p/v y utilizando como disolvente la mezcla 70% etanol; aplicándose distintos t_{rc} (1, 2, 4 y 6 min) y una t_m de 1 min. Como se puede observar, la cantidad extraída de CPT resulta ser muy parecida independientemente de t_{rc} , obteniéndose incluso valores significativamente iguales ($p > 0,05$) entre las extracciones correspondientes a la t_{rc} de 2 min y a la de 6 min (7539 ± 130 y 7473 ± 74 mg CPT/kg ss respectivamente). La máxima extracción se logró con t_{rc} de 1 min, siendo esta de 7764 ± 74 mg CPT/kg ss. Respecto a la recuperación de flavonoides las cantidades extraídas resultaron ser significativamente iguales para todos los t_{rc} , siendo la media de 290 ± 16 mg CFT/kg ss.

Por otro lado, la Fig.11 muestra las extracciones obtenidas mediante EMW a 70 °C con una concentración de sólido RM1 del 5% p/v y utilizando como disolvente la mezcla 70% etanol; aplicándose distintos t_m (1, 5, 10 y 20 min) y una t_{rc} de 1 min. Al analizar el efecto que tiene el empleo de distintos t_m se vuelve a comprobar que, aunque las extracciones de CPT son significativamente distintas ($p < 0,05$), no hay mucha diferencia entre ellas, obteniéndose así valores de extracción parecidos comprendidos entre 8721 ± 84 mg CPT/kg ss (t_m 5 min) y 7763 ± 93 mg CPT/kg ss (t_m 1 min). En cuanto a la recuperación de CFT sí que se observaron más diferencias, obteniéndose un mínimo de extracción de 270 ± 14 mg CFT/kg ss para t_m de 1 min y un máximo de 436 ± 11 CFT/kg ss para t_m de 10 min, siendo este último valor significativamente igual ($p > 0,05$) extraído con t_m de 20 min.

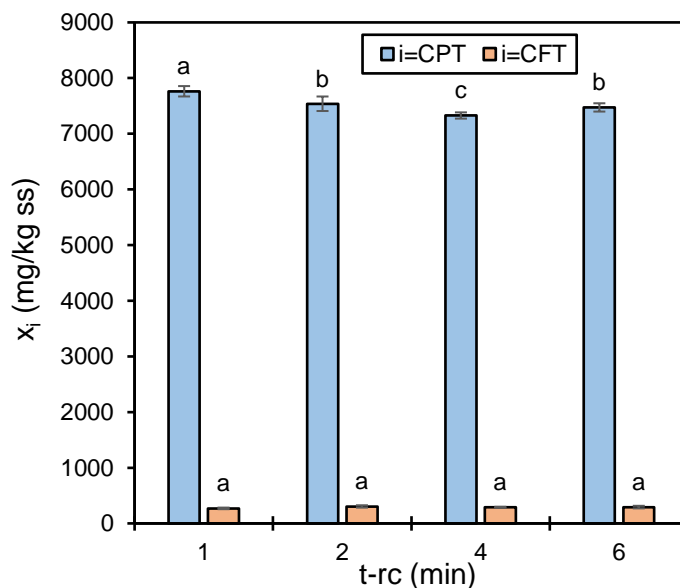


Figura 10. Resultado de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y flavonoides totales (CFT) a 70 °C empleando asistida con microondas (EMW) con una con una carga de sólido RM1 del 5% p/v usando la mezcla 70% etanol como disolvente y aplicándose distintos t_{rc} (1, 2, 4 y 6 min) y una t_m de 1 min.

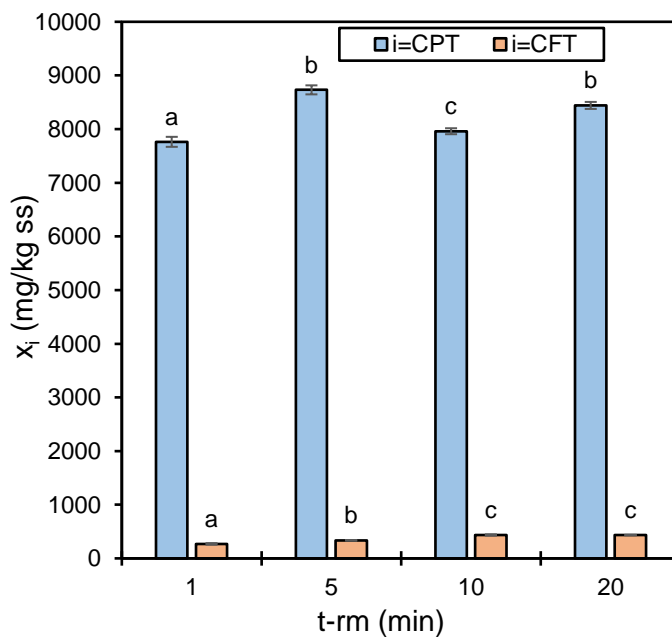


Figura 11. Resultados de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y flavonoides totales (CFT) a 70 °C empleando asistida con microondas (EMW) con una con una carga de sólido RM1 del 5% p/v usando la mezcla 70% etanol como disolvente y aplicándose distintos t_m (1, 5, 10 y 20 min) y una t_{rc} de 1 min.

Comprobando de forma global todos los resultados de todas las extracciones con EMW anteriormente mencionadas (Fig. 10 y Fig.11) podemos ver como se consiguen resultados relativamente parecidos en cuanto a extracción de CPT y CFT (sobre todo en CPT), ya que la extracción máxima de CPT fue de 8721 ± 84 mg CPT/kg ss (t_{rc} 1 y t_m 5 min) y la mínima de 7328 ± 55 mg CPT/kg ss (t_{rc} 4 y t_m 1 min); mientras que la extracción máxima de CFT fue de

436 ± 11 para mg CFT/kg ss (t_{rc} 1 y t_m 10 min) y la mínima de 270 ± 14 mg CPT/kg ss (t_{rc} 1 y t_m 1 min). Dado que la extracción con MW con rampa de calentamiento de 1 min y un tiempo de mantenimiento de la temperatura de 5 min fue la que mayor extracción de CPT consiguió, se empleó esta combinación de tiempos para comprobar el efecto del disolvente en la extracción asistida con EMW.

4.4.2. Estudio del disolvente

Aunque ya se vio que mediante la extracción convencional con agitación rotatoria (AR) el mejor resultado de extracción se obtuvo empleando como disolvente la mezcla 70% etanol, se quiso comprobar si esto se reproducía en la extracción asistida con microondas (EMW).

En la Fig.12 se muestran los resultados de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y flavonoides totales (CFT) a 70 °C empleando EMW con una carga de sólido RM1 del 5% p/v utilizando 100% etanol, 70% etanol y 100% agua como disolventes aplicándose un t_{rc} de 1 min y un t_m de 5 min.

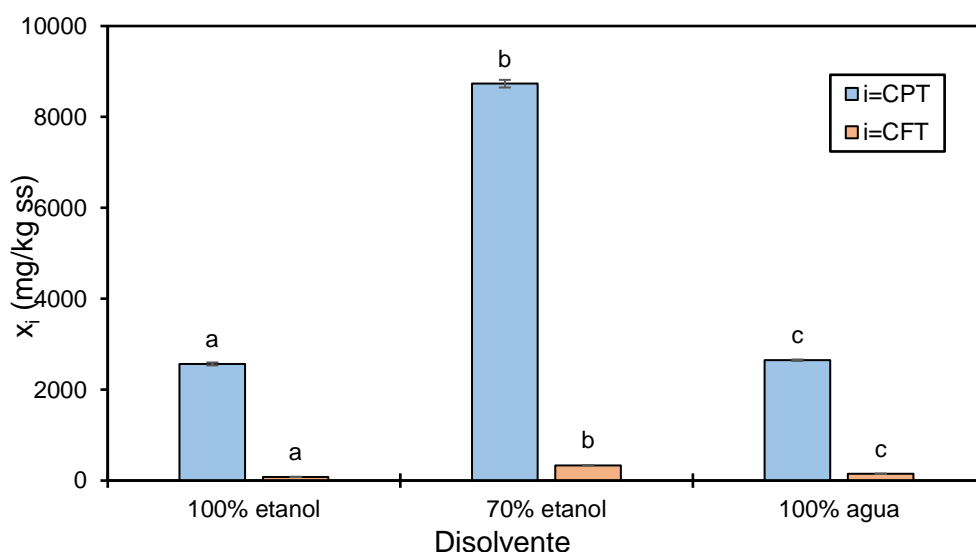


Figura 12. Resultados de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y flavonoides totales (CFT) a 70 °C empleando EMW con una carga de sólido RM1 del 5% p/v utilizando 100% etanol, 70% etanol y 100% agua como disolventes aplicándose un t_{rc} de 1 min y un t_m de 5 min.

Tal y como se observa (Fig.12), los mejores resultados de extracción se obtuvieron gracias al empleo de la mezcla 70% etanol como disolvente, recuperando una cantidad (8732 ± 83 mg CPT/kg) de CPT hasta más de tres veces superior respecto a los extraídos con los disolventes puros (2566 ± 33 mg CPT/kg en 100% etanol y 2647 ± 16 mg CPT/kg en 100% agua). Los resultados de recuperación correspondientes a los disolventes 100% etanol y 100% agua resultaron ser muy parecidos pese a que son significativamente distintos ($p < 0,05$).

Respecto a los CFT, se logró extraer una cantidad entre 2 y 4 veces superior a través del disolvente 70% etanol (336 ± 5 mg CFT/kg), de nuevo en comparación con el uso de 100% etanol y 100% agua. En este caso sí que hay una gran diferencia entre la extracción de CFT entre lo recuperado con el disolvente 100% agua (150 ± mg CFT/kg) y con el disolvente 100% etanol (81 ± 7 mg CFT/kg).

4.4.3. Comparación con convencional con agitación rotatoria

Para concluir con el apartado de resultados se va a comparar la extracción asistida con microondas con la extracción convencional con agitación rotatoria (AR). Para ello se tomaron los resultados de EMW obtenidos con las extracciones del apartado 4.4.2 y para AR se seleccionaron los extractos finales (a las 30 h) correspondientes a las extracciones de los

disolventes 100% etanol, 70% etanol y 100% agua del apartado 4.3.2.. Dichos resultados se muestran a continuación en la Fig.13.

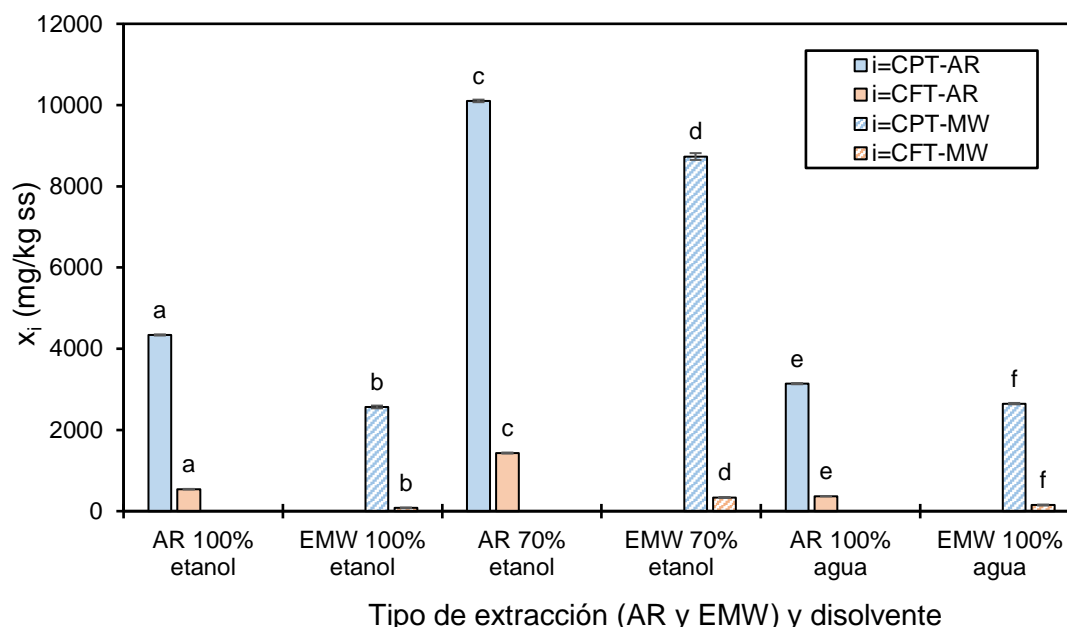


Figura 13. Resultados de extracción de compuestos fenólicos totales (CPT) y flavonoides totales (CFT) a 70 °C mediante extracción asistida con microondas (EMW) con una carga de sólido RM1 del 5% p/v aplicándose un t_{rc} de 1 min y un t_m de 5 min y mediante extracción convencional con agitación rotatoria (AR) utilizando 100% etanol, 70% etanol y 100% agua como disolventes.

Como se puede observar (Fig.13), independientemente del disolvente empleado, siempre se consiguieron mejores resultados de extracción, tanto de CPT como de CFT, a través de extracción en baño con agitación rotatoria (AR). Decir que está diferencia en la extracción en función de la técnica empleada fue más notoria en el caso de los CFT. Para ambas técnicas de extracción, la mayor recuperación se consiguió utilizando el disolvente 70% etanol, donde en el caso de AR se extrajeron 10102 ± 31 mg CPT/kg y en el caso de EMW 8732 ± 83 mg CPT/kg; y aunque el resultado de EMW es peor este supone el 86,35% de lo extraído a través de AR, con la diferencia de que se necesitaron tan solo unos pocos minutos en vez de las 30 h de extracción.

Se ha podido ver que mediante EMW a una temperatura de 70°C se logró un máximo de extracción, el cual no iguala a lo obtenido mediante en baño con agitación rotatoria; pero como indica la bibliografía si en la extracción asistida con microondas se hubiera aplicado una temperatura mayor los resultados hubieran sido mejores a los de extracción convencional en baño con agitación. Esto es debido a que la extracción asistida por microondas emplea la energía de estas para provocar una rotación y movimiento molecular del disolvente, provocando que tanto la muestra como el disolvente se calienten rápidamente mejorando la eficiencia y la eficacia de las extracciones [18,19]. El uso de temperaturas mayores se desestimó por el efecto cocinado de las microondas sobre el sólido.

5.- CONCLUSIONS

Para finalizar con este estudio se procederá a exponer las conclusiones obtenidas tras el análisis de los resultados de las extracciones. Como hemos podido observar el residuo de mazorca de maíz, residuo de la industria agrícola y alimentaria, podría ser un subproducto de interés debido a su revalorización debido a su contenido en compuestos fenólicos y flavonoides. Así pues, las conclusiones se enfocarán primero en la comparación de los dos residuos de maíz empleados continuando con las condiciones de extracción para acabar exponiendo las diferencias encontradas entre las distintas técnicas de extracción.

En cuanto a los residuos de maíz hemos podido comprobar que, pese a que se ha logrado identificar los mismos compuestos, hay diferencias notorias en el contenido de compuestos fenólicos totales y de compuestos flavonoides totales para cada tipo de residuo. En función de que se sabe que hay variedades con mayor contenido de estos compuestos, una manera de optimizar los procesos de extracción sería la de escoger las variedades de mazorca de maíz más ricas en polifenoles.

En cuanto a las extracciones se refiere primero comentar que las relaciones masa/volumen empleadas no parecen afectar a la extracción, por lo que se pueden obtener prácticamente la misma cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides empleando menor cantidad de masa. También se ha podido comprobar que tanto la temperatura como el disolvente son dos parámetros a tener en cuenta, llegando a la conclusión de que mediante el empleo de temperaturas más altas y mezclas etanol-agua (la polaridad del disolvente se modifica), siendo las más efectiva la 70% etanol, se favorece el proceso de extracción. Decir también que, aunque mediante el empleo de agua pura como disolvente se extraen menos compuestos fenólicos a la vez de extraer otras sustancias que afectan a la capacidad reductora, también se logra extraer otros polifenoles que mediante los otros disolventes no se logró; como el ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido vanilínico. Por lo que en función del compuesto en concreto que se desee extraer se podrá utilizar un disolvente u otro. Finalmente, respecto a las distintas técnicas de extracción, en un primer lugar se comprobó que el empleo de ultrasonidos resulta ser más eficiente que la extracción mediante baño con agitación rotatoria, aunque habría que realizar un estudio del coste energético de estos dos métodos para comprobar cuál sería más económicamente rentable a nivel industrial. Respecto a la extracción asistida con microondas hay conclusiones positivas y negativas. Las positivas son que, en comparación con el baño con agitación rotatoria, se logra extraer casi la misma cantidad de compuestos polifenólicos totales en cuestión de muy pocos minutos en vez de tener que emplear 24 horas de extracción, por lo que resulta ser muy eficiente. Sin embargo, decepcionó no lograr una mayor extracción en comparación al baño con agitación como ya se ha mencionado, por lo que habría que continuar realizando distintos experimentos con el microondas en los que se probaran otras temperaturas de extracción mayores, otros tiempos de rampa de calentamiento y otros tiempos de mantenimiento para dar con las condiciones óptimas de extracción para esta técnica.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] P.K. Gandman, M.L. Chinta, N.P.P. Pabbathi, A. Velidandi, M. Sharma, R.C. Kuhad, M. Tabatabaei, M. Aghbashio, R.R. Baadhe, V.K. Gupta (2022). Corncob-based biorefinery: A comprehensive review of pretreatment methodologies, and biorefinery platforms. *Journal of the Energy Institute*. 101: 290-308.
- [2] A.L. Radünz, M. Radünz, A.R. Bizollo, M.A. Tramontin, L.L. Radnünz, M.P. Mariot (2024). Insecticidal and repellent activity of native exotic lemongrass on Maaize Weevil. *Brazilian Journal of Biology*. 84: e252990.
- [3] Tabla de la cosecha de maíz 2020 en Castilla y León, Agricultura y Ganadería Junta de Castilla y León.
- [4] J.Y. Choi, J. Nam, B.Y. Yun, Y.U. Kim, S. Kim (2022). Utilization of corn cob, an essential agricultural residue difficult to disposal: composite board manufactured improved thermal performance using microencapsulated PCM. *Industrial Crops and Products*. 183: 114931.
- [5] R. Melgosa, M.T. Sanz, S. Beltrán. Supercritical CO₂ processing of omega-3 polyunsaturated fatty acids – Towards a biorefinery for fish waste valorization (2021). *The Journal of Supercritical Fluids*. 169: 105121.
- [6] Y. Wang, L. Zang, Q. Hou (2019). Characterization and comparison of lignin derived from corn cob residues to better understand its potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 134: 20-27.

- [7] O. Benito-Román, B. Blanco, M. T. Sanz, S. Beltrán (2021). Freeze-dried extract from onion (*Allium cepa* cv. Horcal) skin wastes: Extraction intensification and flavonoids identification. *Food and Bioproducts Processing*. 130: 92–105.
- [8] P. Alonso-Riaño, M. T. Sanz, B. Blanco, S. Beltrán, E. Trigueros, and O. Benito-Román (2020) Water Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenol Compounds from Brewer's Spent Grain: Kinetic Study, Extract Characterization, and Concentration. *Antioxidants* 9: 265-283.
- [9] R. Wibisono, J. Zhanh, Z. Saleh, D.E. Stevenson, N.I. Joyce (2009). Optimization of accelerated solvent extraction for screening of the health benefits of plant food materials. *Scientific Research*. 1(3): 220-230.
- [10] M. Hernández, J. Ventura, C. Castro, V. Boone, R. Rojas, J. Ascacio-Valdés, G. Martínez-Ávila (2018). UPLC-ESI-QTOF-MS²-Based identification and antioxidant activity assessment of phenolic compounds from red corn cob (*Zea mays* L.). *Molecules*. 23(6): 1425.
- [11] Y.M. Monroy, R.A.F. Rodrigues, A. Sartoratto, F.A. Cabral (2016). Extraction of bioactive compounds from cob and pericarp of purple corn (*Zea mays* L.) by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol, and water as solvents. *Journal of Supercritical Fluids*. 107: 250-259.
- [12] J. Dong, L. Cai, X. Zhu, X. Huang, T. Yin, H. Fang, Z. Ding (2014). Antioxidant Activities and Phenolic Compounds of Cornhusk, Corncob and Stigma. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 25: 1956-1964.
- [13] F. Lao, M.M. Giusti (2018). Extraction of purple corn (*Zea mays* L.) cob pigments and phenolic compounds using food-friendly solvents. *Journal of Cereal Science*. 80: 87-93.
- [14] P. Abbasi-Parizad, P. De Nisi, A. Scarafoni, S. Pili, F. Adani (2021). Recovery of phenolic compounds from agro-industrial by-products: Evaluating antiradical activities and immunomodulatory properties. *Food and Bioproducts Processing*. 127: 338-348.
- [15] Z. Rodríguez, M. Robaina, U. J. Jáuregui, A. Blanco (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias químicas*. 45: 139-147.
- [16] J. Wang, B. Sun, Y. Liu, H. Zhang (2014). Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran. *Food Chemistry*. 150: 482-488.
- [17] Z. Wang, H. Pan, J. Xu, Y. Chag, C. Liu, Y. Zhang, H. Yang, C. Duan, J. Huang, Y. Fu (2022). A sustainable and integrated natural surfactant mediated microwave-assisted extraction technique enhances the extraction of phytochemicals from plants. *Industrial Crops and Products*. 184: 115043.
- [18] Z. Yang, W. Zhai (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS. *Innovative Food & Emerging Technologies*. 11: 470-476.
- [19] M. Bouras, M. Chadni, F.J. Barba, N. Grimi, O. Bals, E. Vorobiev (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus bark*. *Industrial Crops and Products*. 77: 590-601.
- [20] V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Method. Enzymol*. 299: 152–178.
- [21] R.W. Owen, W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: concentration and antioxidant potential

- of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*. 38(8): 647-659.
- [22] S. Pérez-Margariño, S.M. Ortega-Heras, E. Cano-Mozo (2008). Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal and Food Chemistry*. 56(24): 11560-11570.
- [23] C.C. Chang, M.H. Yang, H.M. wen, J.C. Chern (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 178-182.
- [24] I.F. Benzie, J.J. Strain (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of antioxidant power; the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 329: 70-76.
- [25] R. Muangrat, I. Pongsirikul, P.H. Blanco (2018). Ultrasound assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from dried cob of purple waxy corn using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation* 42: e13447.
- [26] A. Ebringerová, Z. Hromádková, J. Alfödi, V. Hříbalová (1998). The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: extractability, structure and properties. *Carbohydrate Polymers*. 37 (3): 231-239.
- [27] Z. Hromádková, J. Kováčiková, A. Ebringerová (1999). Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan. *Industrial Crops and Products*. 9(2): 101-109.
- [28] S. Trehan, N. Singh, A. Kaur (2018). Characteristics of white, yellow, purple corn accessions: phenolic profile, textural, rheological properties and muffin making potential. *Journal of Food Science and Technology*. 55(6): 2334-2343.
- [29] F. Ramos Escudero, A.M. Muñoz, C. Alarado-Ortiz, A. Alvarado; J.A. Yáñez (2012). Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds Profile and Its Assessment as an Agent Against Oxidative Stress in Isolated Mouse Organs. *Journal of Medicinal Food*. 15 (2): 206-215.
- [30] E. Cuevas Montilla, S. Hildebrand, A. Antezana, P. Winterhalter (2011). Soluble and bound phenolic compounds in different Bolivian purple corn (*Zea mays* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(13): 7068-7074.
- [31] A. Ashour, M. Amer, A. Marzouk, K. Shimizu, R. Kondo, S. El-Sharkawy (2013). Corncobs as a Potential Source of Functional Chemicals. *Molecules* 18: 13823-13830.
- [32] S.K. Saha, S. Dey, Runu Chakraborty (2019). Effect of microwave power on drying kinetics, structure, color, and antioxidant activities of corncob. *Journal of Food Process Engineering*. 42(5): 954-962.
- [33] F. V. Macedo, A. Gomes, P. S. da Silva, A. A. da Silva, F. de Assis, L. C. Cunha (2019). Systematic review and technological prospection: ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 29 (2): 73-83.
- [34] G. Scapagnini, D. A. Butterfield, C. Colombrita, R. Sultana, A. Pascale, V. Calabrese (2004). Ethyl Ferulate, a Lipophilic Polyphenol, Induces HO-1 and Protects Rat Neurons Against Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 6 (5): 811-818.
- [35] D.T. Veličković, D.M. Milenović, M.S. Ristić, V.B. Veljković (2006). Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage, *Ultrason. Sonochem.* 13: 150-156.

- [36] J.L.A. Dagostin, D. Carpiné, M.L. Corazza (2015). Extraction of soybean oil using ethanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: Kinetics and thermodynamics, *Ind. Crops Prod.* 74 :69–75